

Received: 2006.09.12
Accepted: 2006.12.12
Published: 2006.12.27

Zastosowanie łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) w badaniach farmakokinetycznych*

Application of real-time PCR to pharmacokinetic studies

Elżbieta Wyska, Mateusz Rosiak

Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Streszczenie

Farmakokinetyka jest dziedziną zajmującą się procesami, jakim lek podlega w organizmie, poczynając od jego wchłaniania z miejsca podania, poprzez dystrybucję z krwi do tkanek, metabolizm z udziałem enzymów, zwłaszcza cytochromu P450, aż do wydalania leku z organizmu. Zarówno wchłanianie leku z przewodu pokarmowego, jak i jego dystrybucja do tkanek może się odbywać z udziałem transporterów błonowych, z których najlepiej poznano P-glikoproteinę i polipeptydy transportujące aniony organiczne (OATP). Geny kodujące wymienione białka, podobnie jak i niektóre enzymy metabolizujące leki, nie tylko wykazują znaczny polimorfizm genetyczny, ale także ich ekspresja może ulegać istotnym zmianom pod wpływem ekspozycji na lek. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) to czuła i precyzyjna technika umożliwiająca ilościową analizę mRNA w komórkach lub tkankach. Może być również stosowana do szybkiego określenia genotypu, co czyni tę metodę szczególnie przydatną w warunkach klinicznych, a także do walidacji wyników uzyskanych za pomocą mikromacierzy.

Celem pracy było przedstawienie możliwości zastosowania techniki PCR w czasie rzeczywistym w badaniach farmakokinetycznych, ze szczególnym uwzględnieniem badania ekspresji genów kodujących enzymy metabolizujące leki i transportery błonowe oraz najnowszych prac dotyczących wpływu genotypu na farmakokinetykę leków. Ponadto wskazano możliwości wykorzystania tej metody do gromadzenia danych przydatnych w modelowaniu farmakokinetycznym oraz farmakokinetyczno-farmakodynamicznym (PK/PD).

Słowa kluczowe:

farmakokinetyka • PCR w czasie rzeczywistym • enzymy metabolizujące leki • transportery błonowe • modelowanie PK/PD

Summary

Pharmacokinetics is a discipline dealing with processes describing the fate of a drug in the body, starting from its absorption at the site of administration, through its distribution to tissues, metabolism via enzymes, mainly those of the cytochrome P450 family, and to its elimination from the body. In both drug absorption and distribution processes, membrane transporters are often involved, among which P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptides (OATP) are probably the best known. Genes coding these proteins as well as many drug metabolizing enzymes are not only highly polymorphic, but their expression may also be significantly altered by the administered drugs. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) is a sensitive and reliable technique enabling quantitative determination of mRNA levels in cells and tissues. It may

* Praca finansowana przez Ministerstwo Edukacji i Nauki, grant nr 2 P05F 032 30.

also be used for rapid genotyping, and is thus especially useful in a clinical setting as well as for validating microarray data.

The aim of this review is to present the utility of real-time PCR in pharmacokinetic studies with special attention paid to the analysis of the expressions of genes coding drug-metabolizing enzymes and membrane transporters as well as to recent studies concerning the impact of genotype on drug pharmacokinetics. Moreover, possibilities of applying this method to collect data for pharmacokinetic and pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling (PK/PD) are indicated.

Key words: pharmacokinetics • real-time PCR • drug-metabolizing enzymes • membrane transporters • PK/PD modeling

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9992.pdf

Word count: 3106

Tables: –

Figures: 3

References: 39

Adres autorki: dr Elżbieta Wyska, Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej, Collegium Medicum UJ, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków; e-mail: mfwyska@cyf-kr.edu.pl

WPROWADZENIE

W kręgu zainteresowań farmakokinetyki znajdują się procesy, jakim lek podlega w organizmie od chwili jego wchłaniania z miejsca podania, poprzez dystrybucję z krwi do tkanek, metabolizm, który dla wielu leków zachodzi przede wszystkim w wątrobie z udziałem izozymów cytochromu P450, aż do eliminacji z organizmu, która może się odbywać przez wydalanie nerkowe, czyli z moczem, oraz pozanerkowe np. z żółcią, potem lub wydychanym powietrzem. Zarówno wchłanianie leku z przewodu pokarmowego, jak i dystrybucja do tkanek może się odbywać z udziałem transporterów błonowych. Niektóre z nich ułatwiają wspomniane procesy, przenosząc leki do wnętrza komórek, inne zaś wręcz przeciwnie, usuwają je na zewnątrz. Dotychczasowe badania nad rolą tego typu transporterów w procesach farmakokinetycznych były prowadzone głównie z wykorzystaniem związków wykazujących zdolność hamowania aktywności tych białek kompetytywnie lub niekompetytywnie [37]. Klasycznym przykładem takiego związku jest znany lek – werapamil, który jest nieselektywnym inhibitorem wielu transporterów błonowych. Łączne podanie tego typu związku z lekiem, będącym substratem takiego transportera, może prowadzić do wystąpienia wielu interakcji ważnych z klinicznego punktu widzenia, zarówno korzystnych (np. wzrost dostępności biologicznej po podaniu doustnym, większe przenikanie leku do miejsca działania), jak i niekorzystnych (np. wzmożona toksyczność leku w wyniku zahamowania transporterów w organach odpowiedzialnych za jego eliminację). Stosunkowo najlepiej poznany transporterem jest P-glikoproteina, białko kodowane przez gen oporności wielolekowej (multidrug resistance – MDR1), mające zdolność aktywnego transportu na zewnątrz komórek wielu ksenobiotyków, w tym także ważnych klinicznie leków, takich jak: leki przeciwnowotworowe, nasercowe, immunosupresyjne oraz inhibitory proteazy HIV. P-glikoproteina jest obecna w wielu narządach, zwłaszcza związanych z eliminacją leku z organizmu, a także barierach fizjologicznych (np. krew-mózg, krew-łożysko), ale szczególnie dużej ekspresji transporter ten ulega w komórkach

nowotworowych, gdzie odpowiada za zjawisko oporności na terapeutyczne stężenia stosowanych chemioterapeutyków [29]. Polipeptydy transportujące aniony organiczne (OATP), kodowane przez nadrodzinę genów SLCO, należą do nieco mniej poznanych transporterów błonowych, których aktywność może odgrywać rolę w farmakokinetyce wielu leków. Według nowej nomenklatury zatwierdzonej przez HUGO Gene Nomenclature Committee, wyróżniamy 6 rodzin tych białek, numerowanych cyframi arabskimi od 1 do 6 [9]. Jeśli w obrębie tej samej rodziny, sekwencja aminokwasów jest identyczna przynajmniej w 60%, transportery stanowią tę samą podrodzinę, oznaczaną dużą literą, a geny należące do tej samej podrodziny noszą kolejne numery oznaczane cyframi arabskimi. Klasyfikacja ta jest więc bardzo zbliżona do przyjętej dla enzymów metabolizujących leki [20]. Większość transporterów OATP jest odpowiedzialna za fizjologiczny transport różnorodnych amfoterycznych cząstek organicznych, takich jak: sole żółciowe, barwniki organiczne, koniugaty hormonów steroidowych, hormony tarczycy, anionowe polipeptydy, a także wielu ksenobiotyków, w tym substancji leczniczych np. digoksyny, enalaprylu, prawastatyny i feksofenadyny. Białka te występują głównie w obrębie bariery krew-mózg, śpicie naczyńiówkowym, płucach, sercu, nerkach, jelitach, łożysku i jądrach. W badaniach farmakokinetycznych największą uwagę zwraca się na dwa z nich: OATP1B1 (dawniej OATP-C) oraz OATP2B1 (dawniej OATP-B).

Cytochrom P-450 (CYP) to grupa enzymów, biorących udział w 70–80% metabolizmu fazy I większości ważnych klinicznie leków. Kodujące je geny zostały podzielone na kilkanaście rodzin, jednak tylko rodziny 1–3 odgrywają istotną rolę w utlenianiu ksenobiotyków, podczas gdy pozostałe są odpowiedzialne za metabolizm substancji endogennych, np. steroidów. U ludzi zidentyfikowano dotąd 39 aktywnych enzymów CYP, które ulegają ekspresji głównie w wątrobie, jelitach, płucach, mózgu i nerkach. Z punktu widzenia farmakokinetyki, szczególnie istotne są podrodziny: 2C (2C9 i C19), 2D (2D6), 3A (3A4 i 3A5), 2E (2E1) i 1A (1A2).

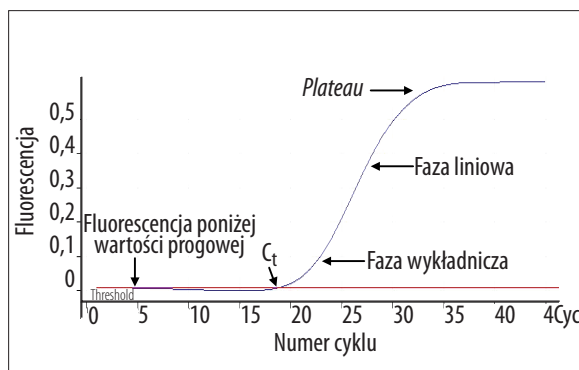
Wyniki najnowszych badań z wykorzystaniem technik biologii molekularnej wykazują, że niektóre substancje mogą modulować aktywność białek transportujących i enzymów metabolizujących leki na poziomie genu [14,16,27]. Ponadto mechanizm wielu interakcji w fazie farmakokinetycznej opiera się na zmianach w ekspresji genów kodujących białka biorące udział w procesach farmakokinetycznych [24]. Niewiele jest jednak doniesień na temat wpływu różnych czynników na ekspresję genów kodujących transportery błonowe czy enzymy metabolizujące leki, zwłaszcza w warunkach *in vivo*, oraz wynikających stąd zmian w farmakokinetyce leków, będących substratami dla tych białek. Główną przeszkodą w prowadzeniu tego typu badań był do niedawna brak szybkiej i czulej metody, umożliwiającej ilościową ocenę ekspresji genu w odpowiedzi na działanie leku, która mogłaby być stosowana w laboratoriach farmakokinetycznych.

Podstawową techniką stosowaną w badaniach farmakogenetycznych jest łańcuchowa reakcja polimerazy (polymerase chain reaction – PCR), pozwalająca amplifikować dowolną sekwencję DNA w warunkach *in vitro*. Za wynalazcę tej metody uważa się kanadyjskiego biochemika – Kary B. Mullisa, który w 1993 r. (wraz z M. Smithem) został za to odkrycie uhonorowany Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii. Obecnie wyróżnić można wiele odmian PCR, z których najbardziej znane to: odwrotna, asymetryczna czy zwielokrotniona PCR. Jest ona także metodą wyjściową dla innych technik, np. takich jak: analiza polimorfizmu długości łańcuchów restrykcyjnych (RFLP-PCR) lub analiza konformacji pojedynczych nici DNA (SSCP-PCR) [3].

Z punktu widzenia analizy ilościowej, głównym ograniczeniem konwencjonalnych metod PCR, oprócz czaso- i pracochłonności, jest trudność w uzyskaniu rzetelnej informacji na temat ilości wyjściowego DNA. Wynika to stąd, że w fazie *plateau* reakcji nie ma bezpośredniej korelacji między ilością końcowego produktu, a początkową liczbą cząsteczek matrycowych. Dlatego też, wykładniczy zakres amplifikacji określa się empirycznie np. przez amplifikację określonej ilości cDNA przy różnej liczbie cykli lub amplifikując kolejne rozcieńczenia matrycy przy tej samej liczbie cykli, a następnie oznaczanie produktu PCR klasycznymi metodami np. densytometrycznie, po wcześniejszej elektroforezie w żelu agarozowym i barwieniu bromkiem etydydy [31]. Innym podejściem jest ilościowa kompetytywna PCR, która jednak, choć stosowana do dzisiaj, także ma wiele ograniczeń, np. konieczność skonstruowania odpowiedniego kompetytora, działanie przy ograniczonym zakresie stosunku ilości matrycy do kompetytora oraz potrzeba przeprowadzenia kolejnego etapu po zakończeniu reakcji, celem dokładnego określenia ilości obu amplikonów [8].

ŁAŃCUCHOWA REAKCJA POLIMERAZY W CZASIE RZECZYWISTYM (REAL-TIME PCR)

Przełomowym wydarzeniem w dziedzinie ilościowego PCR było opracowanie w 1992 r. przez Higuchiego i wsp. łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) [10,11]. W tej odmianie PCR, ilość poddanego amplifikacji DNA jest monitorowana w czasie przebiegu reakcji, dzięki pomiarowi fluorescencji sond lub barwników wprowadzonych do reakcji, które łącząc



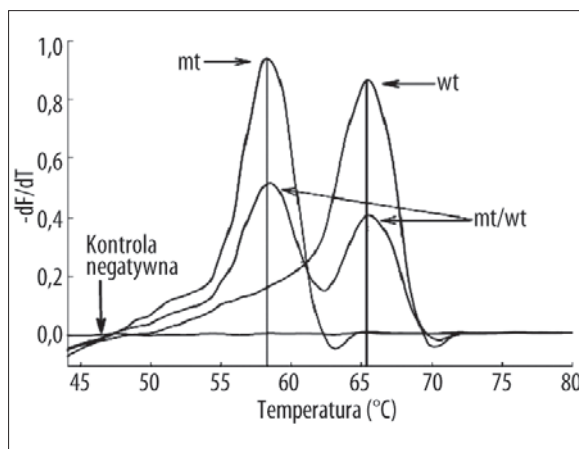
Ryc. 1. Typowy przebieg amplifikacji w czasie rzeczywistym zarejestrowany za pomocą termocyklera RotorGene 3000 (Corbett Research)

się z amplifikowanym DNA, emitują fluorescencję proporcjonalnie do ilości produktu w każdym cyklu reakcji. W przebiegu reakcji PCR można wyróżnić 4 charakterystyczne fazy, przy czym oznaczenie ilościowe zachodzi w fazie wykładniczej reakcji (ryc. 1). Podstawą obliczeń jest cykl progowy (C_t), zdefiniowany jako cykl, przy którym sygnał fluorescencji osiąga pewną wartość progową, którą najczęściej jest 10-krotna wartość odchyień standardowych linii podstawowej mierzonych między trzecim a piątym cyklem. Im większa wyjściowa ilość DNA, tym niższa wartość C_t [7].

Materiałem wyjściowym do analizy we wszystkich odmianach PCR, a więc także z detekcją w czasie rzeczywistym, może być zarówno DNA, jak i RNA. W tym ostatnim przypadku należy zsintetyzować komplementarny DNA (cDNA) za pomocą enzymu odwrotnej transkryptazy, stosując RNA jako matrycę, a metoda nazywana jest w skrócie RT-PCR w czasie rzeczywistym (real-time reverse transcription PCR) lub kinetyczna RT-PCR.

W metodzie RT-PCR w czasie rzeczywistym, ekspresję genu można mierzyć na dwa sposoby: stosując analizę bezwzględną lub względną. Pierwsza z nich, pozwala na określenie początkowej ilości materiału genetycznego, biorącego udział w RT-PCR w jednostkach rzeczywistych np. liczbie kopii oznaczanej sekwencji, znormalizowanej względem określonej liczby ng całkowitego RNA, DNA, w przeliczeniu na komórkę, gram tkanki lub mililitr krwi. Z kolei, w wypadku znacznie częściej stosowanej analizy względnej, wynik stanowi krotność zmiany ekspresji badanego genu pod wpływem procedury doświadczalnej, w odniesieniu do kalibratora, czyli próbki niepoddanej tej procedurze, po znormalizowaniu względem kontroli wewnętrznej, czyli genu referencyjnego, którego poziom ekspresji jest w warunkach eksperymentu stały. Do najczęściej stosowanych genów tego rodzaju należą: dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa (GAPDH), β -aktyna, 18S rRNA i cyklofilina, a więc geny typu „housekeeping” [36].

W analizie względnej należy oszacować wydajność amplifikacji genu badanego i referencyjnego. Jeśli jest jednakowa do obliczeń można zastosować metodę porównania C_t , nazywaną w skrócie $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [15], w przeciwnym razie należy stosować metodę krzywej kalibracji lub model Pfaffla



Ryc. 2. Identyfikacja homozygoty allelu zmutowanego (mt), dzikiego (wt) i heterozygoty (mt/wt) na podstawie wykresu pierwszej pochodnej fluorescencji względem temperatury

[7,25]. Należy dodać, że PCR w czasie rzeczywistym, to nie tylko ilościowa, ale także jakościowa metoda, która może posłużyć do rozróżnienia alleli genów polimorficznych. W tym celu należy przeprowadzić reakcję w obecności sond lub starterów swoistych dla genu typu dzikiego i zmutowanego, a następnie na podstawie krzywej topnienia (ryc. 2) zidentyfikować występowanie homozygot allelu dzikiego i zmutowanego oraz heterozygot [13,23].

BADANIE ZMIAN EKSPRESJI GENÓW W KOMÓRKACH I TKANKACH POD WPLYWEM KSENOBIOTYKÓW

Metoda RT-PCR w czasie rzeczywistym jest niezwykle przydatna do oceny zmian ekspresji genów pod wpływem stanów fizjologicznych, patologicznych oraz stosowanych leków, zarówno w warunkach *in vitro*, jak również *in vivo*. Ze względu na dużą czułość, szczególnie atrakcyjne jest zastosowanie tej techniki do weryfikacji wyników uzyskanych z użyciem mikromacierzy DNA, przez co wykorzystuje się potencjał obu platform jednocześnie [26].

Przykładem zastosowania metody RT-PCR w czasie rzeczywistym do oceny wpływu leków - antagonistów kanałów wapniowych na ekspresję genu MDR1 są badania przeprowadzone z wykorzystaniem linii komórkowej Hvr100-6, które zostały poddane działaniu barnidypiny i werapamilu w stężeniach 1 lub 10 μ M [35]. Wyniki tych badań dowiodły, że oba leki istotnie (w około 50%) obniżyły poziom mRNA genu MDR1 po 72 h inkubacji. Wynika stąd, że z jednej strony długotrwałe podawanie inhibitorów kanałów wapniowych może wpływać na farmakokinetykę jednocześnie podawanych innych leków – substratów P-glikoproteiny, z drugiej zaś, obserwacje te mogą wskazywać nową strategię terapii przeciwnowotworowej, poprzez selektywne obniżenie ekspresji MDR1.

Metoda PCR w czasie rzeczywistym została wykorzystana także do wyjaśnienia przyczyn zmian w farmakokinetyce cyklofosfamid pod wpływem cyprofloksacyny [38]. Badania zostały przeprowadzone na szczurach, które otrzymywały drugi z wymienionych chemioterapeutyków doustnie jeden raz dziennie przez 3 dni, a następnie cyklofosfamid dożylnie w dwóch dawkach: 90 i 150 mg/kg

m.c. Analiza farmakokinetyczna wykazała, że w obecności cyprofloksacyny nastąpił istotny wzrost pola pod krzywą zmian stężenia w czasie (AUC) oraz obniżenie klirensu cyklofosfamid podanego w większej dawce, w porównaniu z grupą kontrolną. W oparciu o technikę PCR w czasie rzeczywistym stwierdzono, że obserwowane zmiany w dyspozycji cyklofosfamid są, m.in. wynikiem hamowania ekspresji genów CYP2C11 i CYP3A1 na poziomie mRNA w wątrobie. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach, interakcja ta ma poważne konsekwencje w przypadku chorych z białaczką, otrzymujących profilaktycznie cyprofloksacynę jednocześnie z cyklofosfamidem przed zabiegiem przeszczepienia szpiku kostnego, znacznie zwiększając prawdopodobieństwo nawrotu choroby [2].

GENOTYPOWANIE Z WYKORZYSTANIEM METODY PCR W CZASIE RZECZYWISTYM

Jak wykazują liczne doniesienia, wszystkie geny kodujące enzymy cytochromu P450, należące do rodzin 1–3, wykazują znaczny polimorfizm. Jednak, z punktu widzenia farmakokinetyki, znaczenie określonych alleli jest różne, podobnie jak częstość ich występowania w poszczególnych grupach etnicznych [12]. Na przykład dotąd zidentyfikowano ponad 60 alleli genu CYP2D6, ale obecność tylko 7 nich (*3, *4, *5, *6, *7, *8 i *16), występujących w populacji kaukaskiej wiąże się z całkowitym brakiem aktywności enzymu. Z kolei wśród mieszkańców Etiopii i Arabii Saudyjskiej można wyróżnić osobników z powielonym genem CYP2D6, co prowadzi do zwiększonego metabolizmu substratów tego enzymu [22]. Zjawisko polimorfizmu genetycznego może prowadzić do nawet 1000-krotnych różnic w szybkości metabolizmu niektórych leków, co pociąga za sobą konieczność podawania dawek różniących się często 10–20 razy, celem uzyskania porównywalnych stężeń leku we krwi [12].

Metoda PCR w czasie rzeczywistym jest w ostatnich latach coraz częściej wykorzystywana w celu określenia genotypu, zwłaszcza w klinice lub w badaniach epidemiologicznych, przede wszystkim ze względu na krótki, nieprzekraczający 2–3 godzin, czas analizy. Co więcej, porównanie wyników genotypowania z wykorzystaniem tej metody i klasycznej metody PCR, dowiodło, że można je stosować zamiennie [17]. W literaturze można obecnie napotkać coraz więcej doniesień, na temat wykorzystania metody PCR w czasie rzeczywistym do tego celu. I tak, w dwóch niezależnych badaniach umożliwiła ona wykrycie fenotypu ultraszybkiego metabolizmu, któremu odpowiada genotyp z powieleniem genu CYP2D6 [1,30]. W badaniach przeprowadzonych w grupie 50 chorych z depresją, otrzymujących amitryptylinę, poszukiwano zależności między genotypem CYP2C19 (stosując konwencjonalny PCR) i CYP2D6 (z użyciem PCR w czasie rzeczywistym) a stężeniem amitryptyliny i nortryptyliny [33]. Wyniki tych badań pozwoliły autorom na opracowanie optymalnego schematu dawkowania amitryptyliny w oparciu o genotyp pacjenta.

Istnieją także doniesienia na temat stosowania omawianej metody do wykrywania polimorfizmu wśród enzymów fazy II metabolizmu, takich jak: N-acetylotransferaza 2 (NAT-2) oraz S-metylotransferaza tiopuryny (TPMT), których niedobór może znamienne wpływać na farmakokinetykę substancji leczniczych, będących ich substratami. Pierwszy z nich

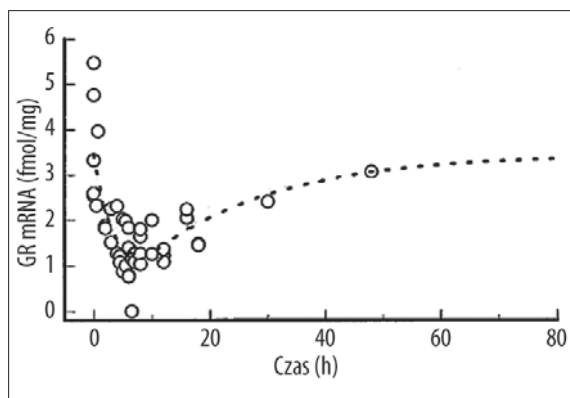
jest odpowiedzialny za sprzęganie z grupą acylową leków o charakterze amin aromatycznych i pochodnych hydrazyny, drugi zaś katalizuje S-metylację, m.in. leków przeciwnowotworowych (6-merkaptopuryna, 6-tioguanina), immunosupresyjnych (azatiopryna), kaptoprylu czy penicylaminy. Metodykę identyfikacji polimorfizmu NAT2 opisano szczegółowo w kilku pracach, wśród których na uwagę, ze względu na małą inwazyjność i krótki, nieprzekraczający 30 minut czas analizy, zasługują badania przeprowadzone w oparciu o próbkę śliny pacjenta [6]. Z kolei w innej pracy przedstawiono metodę zwielokrotnionego PCR w czasie rzeczywistym, która pozwala na jednoczesną identyfikację 8 częstych mutacji TPMT w czasie około 40 minut [32].

Dla wspomnianego już genu MDR1, opisano około 30 rodzajów polimorfizmu pojedynczego nukleotydu, z których najczęściej cytowany w pracach jest C3435T (substytucja cytozyny tymidyną w pozycji 3435). Wpływ tego rodzaju mutacji na farmakokinetykę inhibitora proteazy HIV-1, nel-finawiru badano u dzieci zakażonych wirusem HIV [28]. Stosując metodę PCR w czasie rzeczywistym stwierdzono, że w grupie 71 dzieci: 31 (44%) było homozygotami C/C, 33 (46%) heterozygotami C/T, a 7 (10%) homozygotami T/T. Oszacowane dla tych genotypów parametry farmakokinetyczne różniły się znacznie między hetero- i homozygotami. Genotyp heterozygotyczny wykazywał nie tylko najniższy klirens i najwyższe wartości AUC i stężenia w osoczu zmierzone po 8 godzinach od chwili podania leku, ale dodatkowo stwierdzono, że w 8 tygodniu terapii, aż 91% dzieci z genotypem C/T wykazało spadek wirusowego RNA w osoczu poniżej 400 kopii/ml, podczas gdy u dzieci z genotypem C/C i T/T podobny efekt obserwowano zaledwie u odpowiednio 59 i 57%. Inne badania nad wpływem mutacji C3435T na ekspresję genu MDR1 w dwunastnicy 13 zdrowych ochotników dowiodły, że najniższy poziom mRNA dla MDR1 wykazywali osobnicy z genotypem C/C, najwyższy zaś z genotypem T/T [19]. Wyniki te mogą wyjaśnić istotnie niższe stężenia substratów P-glikoproteiny (np. digoksyny) podawanych doustnie u nosicieli allelu T. Należy stwierdzić, że znajomość genotypu MDR1 może mieć istotne znaczenie w przypadku terapii lekami o wąskim indeksie terapeutycznym i możliwym braku skuteczności spowodowanym opornością, co dotyczy grupy chemioterapeutyków oraz leków antywirusowych.

W ostatnich latach zwraca się także uwagę na konsekwencje polimorfizmu genów kodujących transportery z rodziny OATP. Jako przykład mogą posłużyć badania przeprowadzone w grupie 30 zdrowych ochotników, u których oceniano zależność między genotypem OATP-C a parametrami farmakokinetycznymi prawastatyny po padaniu doustnym tego leku w jednorazowej dawce 40 mg [18]. Jak wykazano, obecność genu zmutowanego (*5) wiązała się z wyższą wartością AUC i stężenia maksymalnego (C_{max}), w porównaniu z genotypem (*1a/*1a) oraz nosicielami allelu (*1b). Wprawdzie w przedstawionej pracy do określenia genotypu OATP wykorzystano metodę RFLP-PCR, to do chwili obecnej opisano już metodę genotypowania w oparciu o technikę PCR w czasie rzeczywistym [21].

ROLA RT-PCR W CZASIE RZECZYWISTYM W MODELOWANIU PK/PD

Modelowanie farmakokinetyczno-farmakodynamiczne (PK/PD) to metodologia, która łączy zależność stężenia



Ryc. 3. Zmierzone eksperymentalnie (○) oraz przewidywane w oparciu o model PK/PD (—) zmiany poziomu mRNA receptora glukokortykosteroidów w czasie (zaadaptowane z [34])

leku od czasu z intensywnością odpowiedzi farmakologicznej w oparciu o odpowiednie modele matematyczne. Model PK/PD powinien się opierać na mechanizmie działania leku. Do jego opracowania konieczne są odpowiednie dane farmakodynamiczne, które może stanowić zarówno bezpośrednio mierzony efekt kliniczny, jak i odpowiedni biomarker, który pozwala przewidywać efekt farmakologiczny. Jednym z markerów odpowiedzi farmakologicznej na lek może być poziom mRNA [4].

Model PK/PD wykorzystujący ten rodzaj markera zastosowano do opisu zmian ekspresji receptora glukokortykosteroidów po jednorazowym podaniu szczurom metyloprednizolonu w dawce 50 mg/kg m.c. drogą dożylną [34]. Zmiany poziomu mRNA tego receptora w mięśniu szkieletowym szczura opisano za pomocą farmakodynamicznego modelu odpowiedzi pośredniej, który uwzględnia opóźnione występowanie efektu farmakologicznego w odniesieniu do maksymalnego stężenia leku we krwi [5]. Zastosowany model zakłada, że kompleks lek-receptor zwiększa stopień degradacji mRNA badanego receptora w cytoplazmie, a zmiany poziomu mRNA receptora w czasie można opisać za pomocą następującego równania:

$$\frac{dmRNA_{GR}}{dt} = k_{syn,GRmRNA} - k_{dgr,GRmRNA} \times \left(1 + \frac{S_{max,GRmRNA} \times DR}{SC_{50,GRmRNA} + DR} \right) \times mRNA_{GR}$$

gdzie:

DR – poziom kompleksu lek-receptor w cytoplazmie, $S_{max,GRmRNA}$ – maksymalna zdolność leku do stymulacji procesu degradacji mRNA receptora glukokortykosteroidów (GR mRNA), $SC_{50,GRmRNA}$ – poziom kompleksu DR, przy którym występuje 50% maksymalnej stymulacji rozpadu GR mRNA, $k_{syn,GRmRNA}$ – stała szybkości zerowego rzędu dla transkrypcji GR mRNA, $k_{dgr,GRmRNA}$ – stała szybkości pierwszego rzędu dla procesu degradacji GR mRNA.

Obserwowane i przewidywane w oparciu o model odpowiedzi pośredniej zmiany poziomu mRNA receptora glukokortykosteroidów w czasie przedstawiono na rycinie 3.

Poziom mRNA receptora glukokortykosteroidów obniżył się do około 35% wartości podstawowej ($mRNA_{GR,0}$) w ciągu 7,4 godziny, a następnie powoli – w ciągu 2–3 dni od chwili

podania metyloprednizolonu – wracał do wartości początkowej (ryc. 3). Oszacowane techniką regresji nieliniowej parametry farmakodynamiczne badanego leku wynosiły: $S_{\max,GR\ mRNA} = 5,25$, $SC_{50,GR\ mRNA} = 1,61\text{ nmol/L/mg białka}$, $k_{\text{syn},GR\ mRNA} = 0,157\text{ fmol/g/h}$ i $k_{\text{deg},GR\ mRNA} = 0,046\text{ h}^{-1}$.

Przydatność modelowania PK/PD nie ogranicza się do dobrze zaplanowanych badań, prowadzonych na relatywnie małej grupie osobników i przy często wykonywanych pomiarach stężeń leku oraz odpowiedzi farmakologicznej. Dane uzyskane w późniejszych fazach badań klinicznych czy w ramach rutynowego postępowania klinicznego, a więc wtedy, gdy dżerzenie leku i efekt są mierzone znacznie rzadziej, a liczba tych pomiarów w poszczególnych osobników w badanej grupie nie jest jednakowa, mogą posłużyć do opracowania modelu populacyjnego. W odróżnieniu od modelowania indywidualnego, modelowanie populacyjne pozwala ocenić wpływ cech zależnych od chorego (covariates), np. takich jak: wiek, płeć, masa ciała, klirens kreatyniny, jednocześnie stosowanie innych leków, współistniejące schorzenia lub genotyp na wartości parametrów PK/PD.

W badaniach dotyczących wpływu genotypu MDR1 na międzysobnicze zróżnicowanie w dyspozycji cyklosporyny A, którą podawano doustnie 2 razy dziennie pacjentom po przeszczepie nerki wykazano, że stacjonarne stężenia tego leku u chorych – homozygot typu dzikiego (C/C) były znacznie wyższe, a klirens niższy w stosunku do nosicieli zmutowanego allelu 3435T [39]. Wpływ genotypu MDR1 C3435T na dyspozycję badanego leku oceniano w oparciu o dwie alternatywne hipotezy, zakładające wpływ genotypu na wartość klirensu (CL/F) lub na względną dostępność biologiczną – FR, co przedstawiono za pomocą następujących równań:

$$CL/F = \Theta_1 \times (1 + \text{genotyp}\Theta_2)$$

$$FR = 1 - \text{genotyp} \times \Theta_2$$

W przedstawionych równaniach Θ_1 – to populacyjna wartość CL/F u osobników będących homozygotami typu

dzikiego (C/C), a Θ_2 to zmiana klirensu lub względnej dostępności biologicznej wywołana obecnością allelu zmutowanego (3435T). Wartość genotypu przyjęto za równą 1 dla nosicieli allelu zmutowanego i 0 dla homozygot typu dzikiego. Wyniki przeprowadzonej analizy populacyjnej z wykorzystaniem programu NONMEN, dowiodły, że różnice w wielkości CL/F obserwowane u osobników ze zmutowanym genem MDR1, wynikają ze zmniejszonej biodostępności leku. Tak więc włączenie genotypu do modelu populacyjnego, pomogło wyjaśnić jedną z przyczyn zróżnicowania klirensu cyklosporyny A w badanej populacji.

POSUMOWANIE

Włączenie technik biologii molekularnej do badań farmakokinetycznych pozwala na znaczne przyspieszenie badań nad nowym lekiem, ułatwiając poszukiwanie nowych biomarkerów oraz wskazując nowe mechanizmy zaangażowane na procesy wchłaniania, dystrybucji i eliminacji leku. Ponadto, techniki te mogą być pomocne w wyjaśnieniu podłoża wielu interakcji w fazie farmakokinetycznej. Przez określenie genotypu chorego, możliwe jest przewidywanie zmienności w farmakokinetyce na poziomie molekularnym, co pozwala na wczesne wykrycie czynników wpływających na parametry farmakokinetyczne, a uzyskane w ten sposób informacje mogą posłużyć do bardzo precyzyjnego doboru dawki dla indywidualnego chorego. Spośród znanych technik stosowanych do ilościowej analizy ekspresji genu, RT-PCR w czasie rzeczywistym, zasługuje na szczególną uwagę ze względu na dużą czułość, dokładność i powtarzalność. Ponadto umożliwia ona oznaczenie poziomu DNA w nieosiągalnym dotychczas zakresie 7–8 rzędów wielkości, a przeciętny czas analizy rzadko przekracza 2 godziny. Metoda PCR w czasie rzeczywistym jest również coraz częściej wykorzystywana do szybkiego genotypowania, zwłaszcza na użytek kliniki. Pewnym ograniczeniem w stosowaniu tej techniki, w porównaniu z klasycznym PCR, są ciągle jeszcze wysokie koszty aparatury i odczynników.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Bodin L., Beaune P.H., Lorient M.A.: Determination of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene copy number by real-time quantitative PCR. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2005; 3: 248–253
- [2] Carlsen S., Ringden O., Aschan J., Hagglund H., Ljungman P., Mattson J., Rembecker M.: Risk factors in bone marrow transplant recipients with leukaemia. Increased relapse risk in patients treated with ciprofloxacin for gut decontamination. *Clin. Transplant.*, 1998; 12: 84–92
- [3] Cyniak-Magierska A., Brzezińska E., Lewiński A.: Łańcuchowa reakcja polimerazy – rodzaje, metodyka i zastosowanie. *Endokrynologia Polska*, 2000; 51: 159–167
- [4] Danhof M., Alvan G., Dahl S.G., Kuhlmann J., Paintaud G.: Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling – a new classification of biomarkers. *Pharm. Res.*, 2005; 22: 1432–1437
- [5] Dayneka N., Garg V., Jusko W.J.: Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic responses. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 1993; 21: 457–478
- [6] French D.J., Archard C.L., Andersen M.T., McDowell D.G.: Ultra-rapid DNA analysis using HyBeacon probes and direct PCR amplification from saliva. *Mol. Cell. Probes*, 2002; 16: 319–326
- [7] Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C.: An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 2001; 25: 386–401
- [8] Haberhausen G., Pinsl J., Kuhn C.C., Markert-Hahn C.: Comparative study of different standardization concepts in quantitative competitive reverse transcription-PCR assays. *J. Clin. Microbiol.*, 1998; 3: 628–633
- [9] Hagenbuch B., Meier P.J.: Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.*, 2004; 447: 653–665
- [10] Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R.: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*, 1992; 10: 413–417
- [11] Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R.: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*, 1993; 11: 1026–1030
- [12] Ingelman-Sundberg M.: Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2004; 25: 193–200
- [13] Jannetto P.J., Laleli-Sahin E., Wong S.H.: Pharmacogenomic genotyping methodologies. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004; 42: 1256–1264
- [14] Kupsáková I., Rybár A., Dočolomanský P., Drobná Z., Stein U., Walther W., Barančík M., Breier A.: Reversal of P-glycoprotein mediated vincristine resistance of L1210/VCR cells by analogues of pentoxifylline. A QSAR study. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004; 21: 283–293

- [15] Livak K.J., Schmittgen T.D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001; 25: 402–408
- [16] Lown, K.S., Kolars, J.C., Schmiedlin-Ren, P., Watkins, P.B.: Induction of MDR1 expression in normal rat and human intestine *in vivo*. *Gastroenterology*, 1996; 110: A344
- [17] Müller B., Zöpf K., Bachofer J., Steimer W.: Optimized strategy for rapid cytochrome P450 2D6 genotyping by real-time long PCR. *Clin. Chem.*, 2003; 49: 1624–1631
- [18] Mwinyi J., John A., Bauer S., Roots I., Gerloff T.: Evidence for inverse effects of OATP-C (SLC21A6)*5 and *1b haplotypes on pro-vastatin kinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2004; 75: 415–421
- [19] Nakamura T., Sakaeda T., Horinouchi M., Tamura T., Aoyama N., Shirakawa T., Matsuo M., Kasuga M., Okumura K.: Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2002; 71: 297–303
- [20] Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W.: P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 1996; 6: 1–42
- [21] Op den Buijsch R.A., Wijnen P.A., van Diejen-Visser M.P., de Vries J.E., Bekers O.: Rapid genotyping of the OATP1B1 polymorphisms A388G and T521C with real-time PCR FRET assays. *Pharmacogenomics*, 2005; 6: 393–397
- [22] Oscarson M.: Pharmacogenetics of drug metabolising enzymes: importance for personalized medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003; 41: 573–580
- [23] Papp A.C., Pinsonneault J.K., Cooke G., Sadée W.: Single nucleotide polymorphism genotyping using allele-specific PCR and fluorescence melting curves. *Biotechniques*, 2003; 34: 1068–1072
- [24] Peterson T.C., Peterson M.R., Wornell P.A., Blanchard M.G., Gonzalez F.J.: Role of CYP1A2 and CYP2E1 in the pentoxifylline ciprofloxacin drug interaction. *Biochem. Pharmacol.*, 2004; 68: 395–402
- [25] Pfaffl M.W.: *Livestock transcriptomics: Quantitative mRNA analytics in molecular endocrinology and physiology. Habilitation 2003.* <http://www.gene-quantification.de/habilitation-pfaffl-livestock-transcriptomics.pdf> (20.12.2006)
- [26] Rajeevan M.S., Vernon S.D., Taysavang N., Unger E.R.: Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J. Mol. Diagn.*, 2001; 3: 26–31
- [27] Sachdeva K., Yan B., Chichester C.O.: Lipopolysaccharide and cecal ligation/puncture differentially affect the subcellular distribution of the pregnane X receptor but consistently cause suppression of its target genes CYP3A. *Shock*, 2003; 19: 469–474
- [28] Saitoh A., Singh K.K., Powell C.A., Fenton T., Fletcher C.V., Brundage R., Starr S., Spector S.A.: An MDR1-3435 variant is associated with higher plasma nelfinavir levels and more rapid virologic response in HIV-1 infected children. *AIDS*, 2005; 19: 371–380
- [29] Sakaeda T., Nakamura T., Okumura K.: Pharmacogenetics of drug transporters and its impact on the pharmacotherapy. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2004; 4: 1385–1398
- [30] Schaeffeler E., Schwab M., Eichelbaum M., Zanger U.M.: CYP2D6 genotyping strategy based on gene copy number determination by TaqMan real-time PCR. *Hum. Mutat.*, 2003; 22: 476–485
- [31] Schmittgen T.D., Zakrajsek B.A., Mills A.G., Gorn V., Singer M.J., Reed M.W.: Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal. Biochem.*, 2000; 285: 194–204
- [32] Schutz E., von Ahsen N., Oellerich M.: Genotyping of eight thiopurine methyltransferase mutations: three-color multiplexing, “two-color/shared” anchor, and fluorescence-quenching hybridization probe assays based on thermodynamic nearest-neighbor probe design. *Clin. Chem.*, 2000; 46: 1728–1737
- [33] Steimer W., Zöpf K., von Amelunxen S., Pfeiffer H., Bachofer J., Popp J., Messner B., Kissling W., Leucht S.: Allele-specific change of concentration and functional gene dose for the prediction of steady-state serum concentrations of amitriptyline and nortriptyline in CYP2C19 and CYP2D6 extensive and intermediate metabolizers. *Clin. Chem.*, 2004; 50: 1623–1633
- [34] Sun Y.N., McKay L.I., DuBois D.C., Jusko W.J., Almon R.R.: Pharmacokinetic/pharmacodynamic models for corticosteroid receptor down-regulation and glutamine synthetase induction in rat skeletal muscle by a receptor/gene-mediated mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999; 288: 720–728
- [35] Takara K., Sakaeda T., Tanigawara Y., Nishiguchi K., Ohmoto N., Horinouchi M., Komada F., Ohnishi N., Yokoyama T., Okumura K.: Effects of 12 Ca²⁺ antagonists on multidrug resistance, MDR1-mediated transport and MDR1 mRNA expression. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2002; 16: 159–165
- [36] Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A., Heinen E.: Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.*, 1999; 75: 291–295
- [37] Thomas H., Coley H.M.: Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control*, 2003; 10: 159–165
- [38] Xie H.J., Boberg U., Griskevicius L., Lundgren S., Carlens S., Meurling L., Paul C., Rane A., Hassan M.: Alteration of pharmacokinetics of cyclophosphamide and suppression of the cytochrome P450 genes by ciprofloxacin. *Bone Marrow Transplant.*, 2003; 31: 197–203
- [39] Yates C.R., Zhang W., Song P., Li S., Gaber A.O., Kotb M., Honaker M.R., Alloway R.R., Meibohm B.: The effect of CYP3A5 and MDR1 polymorphic expression on cyclosporine oral disposition in renal transplant patients. *J. Clin. Pharmacol.*, 2003; 43: 555–564